

EFFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN LA PRODUCTIVIDAD DE
METABOLITOS DE VALOR AGREGADO EN *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803

LEIDY TATIANA PORRAS CÁRDENAS
CARLOS EDUARDO PRADA RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2012

EFFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN LA PRODUCTIVIDAD DE
METABOLITOS DE VALOR AGREGADO EN *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803

LEIDY TATIANA PORRAS CÁRDENAS
CARLOS EDUARDO PRADA RODRÍGUEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL
TÍTULO DE: INGENIERO QUÍMICO

DIRECTORES
PH. D VIATCHESLAV KAFAROV
M.SC. CRISÓSTOMO BARAJAS
CODIRECTOR
BIÓLOGO ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2012

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL..... | 16 |
| 1.1 MICROALGA Y MEDIO DE CULTIVO..... | 16 |
| 1.2 DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTOS..... | 17 |
| 1.3 MEDICIONES | 17 |
| 1.3.1 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA | 17 |
| 1.3.2 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS..... | 18 |
| 1.3.3 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES..... | 18 |
| 1.3.4 DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS POR EXTRACCIÓN..... | 19 |
| 1.3.5 DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS | 19 |
| 1.3.6 CONSUMO DE NITRATO (NO ₃ -N)..... | 20 |
| 1.3.7 CONSUMO DE FOSFATO (PO ₄ -P)..... | 20 |
| 1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 21 |
| 2. RESULTADOS Y ANÁLISIS | 22 |
| 2.1 PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y ACETATO..... | 22 |
| 2.2 PRODUCTIVIDAD DE CARBOHIDRATOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y ACETATO..... | 24 |
| 2.3 PRODUCTIVIDAD DE PROTEÍNAS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y ACETATO..... | 28 |
| 2.4 PRODUCTIVIDAD DE PIGMENTOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y ACETATO..... | 30 |
| 2.5 PRODUCTIVIDAD DE LÍPIDOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y ACETATO..... | 32 |
| 2.6 COMPOSICIÓN PORCENTUAL DE LA BIOMASA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO..... | 35 |
| CONCLUSIONES | 39 |

RECOMENDACIONES.....40
BIBLIOGRAFÍA.....41

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Descripción metodológica del proceso. | 16 |
| Figura 2. Productividad de biomasa en función del tiempo a diferentes concentraciones de acetato y nitrato (a) T ₁ (1,03mM nitrato y 5mM acetato); T ₂ (1,03mM nitrato y 10mM acetato); T ₃ (1,03mM nitrato y 20mM acetato); control (2,94mM nitrato y 0mM acetato), (b) T ₄ (1,47mM nitrato y 5mM acetato); T ₅ (1,47mM nitrato y 10mM acetato); T ₆ (1,47mM nitrato y 20mM acetato); control (2,94mM nitrato y 0mM acetato), (c) T ₇ (2,94mM nitrato y 5mM acetato); T ₈ (2,94mM nitrato y 10mM acetato); T ₉ (2,94mM nitrato y 20mM acetato); control (2,94mM nitrato y 0mM acetato) | 23 |
| Figura 3. (a) Composición porcentual de la biomasa en el día 5 de cultivo, (b) Composición porcentual de la biomasa en el día 10 de cultivo y (c) Composición porcentual de la biomasa en el día 15 de cultivo. | 36 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Concentraciones de nitrato y acetato para los nueve tratamientos..... | 17 |
| Tabla 2.Productividad de Carbohidratos(g/l) en función del tiempo para los nueve tratamientos. | 25 |
| Tabla 3. Cantidad porcentual de Carbohidratos en la biomasa. | 26 |
| Tabla 4.Concentración de Xilosa y Glucosa (g/l) en la biomasa y el extracto de pigmentos. | 27 |
| Tabla 5. Productividad de Carbohidratos en función del porcentaje de nitrógeno y fósforo consumido..... | 27 |
| Tabla 6. Productividad de Proteínas en función del tiempo para los nueve tratamientos. | 28 |
| Tabla 7. Cantidad porcentual de Proteínas en la biomasa. | 29 |
| Tabla 8. Productividad de Proteínas en función del porcentaje de nitrógeno y fósforo consumido..... | 30 |
| Tabla 9.Productividad de Pigmentos en función del tiempo para los nueve tratamientos. | 30 |
| Tabla 10. Cantidad porcentual de Pigmentos en la biomasa..... | 31 |
| Tabla 11. Productividad de Pigmentos en función del porcentaje de nitrógeno y fósforo consumido..... | 32 |
| Tabla 12. Productividad de Lípidos en función del tiempo para los nueve tratamientos. | 33 |
| Tabla 13. Cantidad porcentual de Lípidos en la biomasa. | 34 |
| Tabla 14. Productividad de Lípidos en función del porcentaje de nitrógeno y fósforo consumido..... | 35 |

RESUMEN

TÍTULO: EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN LA PRODUCTIVIDAD DE METABOLITOS DE VALOR AGREGADO EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803*

AUTORES:

PORRAS Cárdenas Leidy Tatiana **

PRADA Rodríguez Carlos Eduardo **

PALABRAS CLAVE: *Chlorella vulgaris*, metabolito, condiciones mixotróficas.

Descripción

Tanto el tiempo de cultivo, como las modificaciones realizadas al medio Bold Basal, incrementan la productividad de biomasa, carbohidratos, proteínas, lípidos y pigmentos en cultivos semi-continuos de microalgas. Se analizó el efecto del tiempo de cultivo en la productividad de metabolitos de valor agregado en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. Para ello, se realizó el montaje experimental de nueve tratamientos bajo condiciones mixotróficas (acetato: 5, 10 y 20mM y nitrato: 1,03, 1,47 y 2,94mM); posteriormente se midió la biomasa y los compuestos metabólicos producidos durante los días 0, 5, 10 y 15 de cultivo. De los resultados obtenidos, se pudo concluir que el mejor escenario para la obtención de biomasa fue T₉ (2,94mM nitrato y 20mM acetato) con una productividad de 3,8900g/l, 2 veces mayor respecto al control (2,94mM nitrato y 0mM acetato) en tan solo 10 días de cultivo. Para el caso de proteínas y carbohidratos, el mejor escenario fue el control con una producción de 0,1607g/l de carbohidratos (14% de la biomasa total) y 0,5886g/l de proteínas (53% de la biomasa total) en los 5 primeros días. En cuanto a la producción de lípidos, el mejor escenario fue T₇ (2,94mM nitrato y 5mM acetato), con una productividad de 0,5003g/l (21% de la biomasa total), 10 veces mayor respecto al tratamiento control en 10 días. Finalmente, se pudo apreciar que la productividad de pigmentos totales no fue representativa (hasta 5% de la biomasa total), por tanto se puede aprovechar este metabolito de cualquiera de los escenarios planteados.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías FísicoQuímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Directores: Ph.D. KAFAROV Viatcheslav y M.Sc. BARAJAS Crisóstomo. Codirector: Biólogo BARAJAS Andrés Fernando.

ABSTRACT

TITLE: CULTURE TIME'S EFFECT ON THE VALUE-ADDED METABOLITES' PRODUCTIVITY IN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803*

AUTHORS:

PORRAS Cárdenas Leidy Tatiana **

PRADA Rodríguez Carlos Eduardo **

KEY WORDS: *Chlorella vulgaris*, metabolite, mixotrophics conditions.

Description

Both, the culture time and the modifications made to the bold basal culture, increase the biomass, carbohydrates, proteins, lipids and pigments' productivity in microalgas' semi-continuous cultures. It was analyzed culture time's effect on the value-added metabolites' productivity in *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. For that, it was made the assembly of nine treatments under mixotrophics conditions (acetate: 5, 10 and 20mM and nitrate: 1,03, 1,47 and 2,94mM); after that, biomass and metabolic compounds were measured during the 0, 5, 10 and 15 culture days. From the obtained results it is concluded that the best scenario for biomass' production was T₉ (2,94mM nitrate and 20mM acetate), with a productivity of 3,8900g/l, 2 times higher than the control treatment (2,94mM nitrate and 0mM acetate) in just 10 days of culture. In the case of carbohydrates and proteins, the best scenario was the control treatment with a production of 0,1607g/l of carbohydrate (14% of total biomass) and 0,5886g/l of protein (53% of total biomass) in the first 5 days. Regarding the lipids' production, the best scenario was T₇ (2,94mM nitrate and 5mM acetate), with a productivity of 0,5003g/l (21% of total biomass), 10 times higher compared to the control treatment in 10 days. Finally, it could be seen that the total pigments' productivity was not representative (untill 5% of total biomass), therefore this metabolite can be exploited for any of the presented scenarios.

*Thesis.

**Faculty of Physicochemical Engineering. Department of Chemical Engineering. Directores: Ph.D. KAFAROV Viatcheslav y M.Sc. BARAJAS Crisóstomo. Codirector: Biólogo BARAJAS Andrés Fernando.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas usan dióxido de carbono, agua, energía lumínica y algunos nutrientes inorgánicos, para sintetizar diversos metabolitos (proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos) por medio de la fotosíntesis (Chisti, 2007), por tanto, constituyen una opción adecuada para la producción de compuestos tales como biodiesel, bioetanol, biometano, biohidrógeno, además de algunos fármacos, productos de cosméticos, alimento para animales y suplementos proteicos de alto nivel nutricional (Schenk *et al.*, 2008), (Spolaore *et al.*, 2006).

Algunas especies, presentan amplios espectros de ácidos grasos, en comparación con las plantas oleaginosas, que contienen una estructura molecular con incluso más de 18 átomos de carbono (Belarbi *et al.*, 2000). Estos microorganismos, amplían la perspectiva respecto a la producción de aceites, debido a su capacidad de generar hasta treinta veces más aceite que la semilla de soya por unidad de área. Su gran importancia, está relacionada con la calidad de los ácidos grasos, que son en gran parte insaturados como el linoleico, ecosapentanoico, y el ácido docosahexanoico (Skjak-Braek, 1992). Además se encontró que poseen gran potencial para ser usadas como materia prima en la elaboración de biodiesel, pues presentan altas tasas de crecimiento y producción de lípidos transesterificables (Brennan & Owende, 2010). Cuando las microalgas son sometidas a condiciones de estrés impuestas por estímulos ambientales, físicos (temperatura e intensidad luminosa) y químicos (deficiencia de nitrógeno, fósforo, azufre y silicio, salinidad y pH del medio de cultivo), solos o en combinación, puede ocurrir síntesis y acumulación de triglicéridos, acompañada de alteraciones en la composición de lípidos y ácidos grasos. La carencia de nitrógeno, es respecto a los nutrientes el factor que más afecta la producción de lípidos (De & Chaudhury, 1999), (Li *et al.*, 2008), (Hu *et al.*, 2008), (Mendoza *et al.*, 2008), (Solovchenko *et al.*, 2008), (Gouveia & Oliveira, 2009), (Rodolfi *et al.*, 2009).

Ciertos pigmentos obtenidos a partir de microalgas, son usados como colorantes naturales en alimentos, cosméticos y en investigación (Borowitzka, 1995). La astaxantina, un carotenoide producido por *Haematococcus pluvialis* ha sido empleada con éxito en la alimentación de salmones, con el fin de dar color rosa intenso a la carne de éstos peces, haciendo más atractivo el producto para los consumidores (Olaizola, 2003). Otros carotenoides como la luteína y la zeaxantina, también se han usado en la alimentación de peces y aves de corral (Pulz & Gross, 2004).

Chlorella vulgaris, contiene entre 51-58% de proteínas, 12-17% de carbohidratos, 14-22% lípidos y una cantidad considerable de carotenoides y vitaminas (Becker, 2004). Se ha determinado que este microorganismo, bajo condiciones de oscuridad, en fotobioreactores cerrados, y a altas concentraciones salinas, es capaz de producir etanol y otros alcoholes por medio de la fermentación anaeróbica del almidón, que se puede acumular tras la fotosíntesis o que puede suministrarse al cultivo directamente. Esta tecnología representa un potencial de producción de 10.000 galones por hectárea al año, y se estima que pueda convertir una tonelada de CO₂ en aproximadamente 60-70 galones de etanol (Ami, 2008).

Sin embargo la producción de biocombustibles a partir de la biomasa algal no es del todo rentable, debido a que la fracción lipídica extraída de las células, se encuentra en menor proporción respecto a metabolitos predominantes como proteínas, lo cual requiere la valorización integral de la materia prima total, mediante lo que se denomina biorefinería (González & Kafarov, 2011). Las biorefinerías pueden ser definidas como instalaciones que integran el proceso de conversión de biomasa y la infraestructura para producir combustibles, energía, materiales y otras sustancias químicas a partir de la misma. Mediante la obtención de múltiples productos, una biorefinería puede tomar ventaja de las diferencias existentes entre los componentes celulares e intermediarios metabólicos y

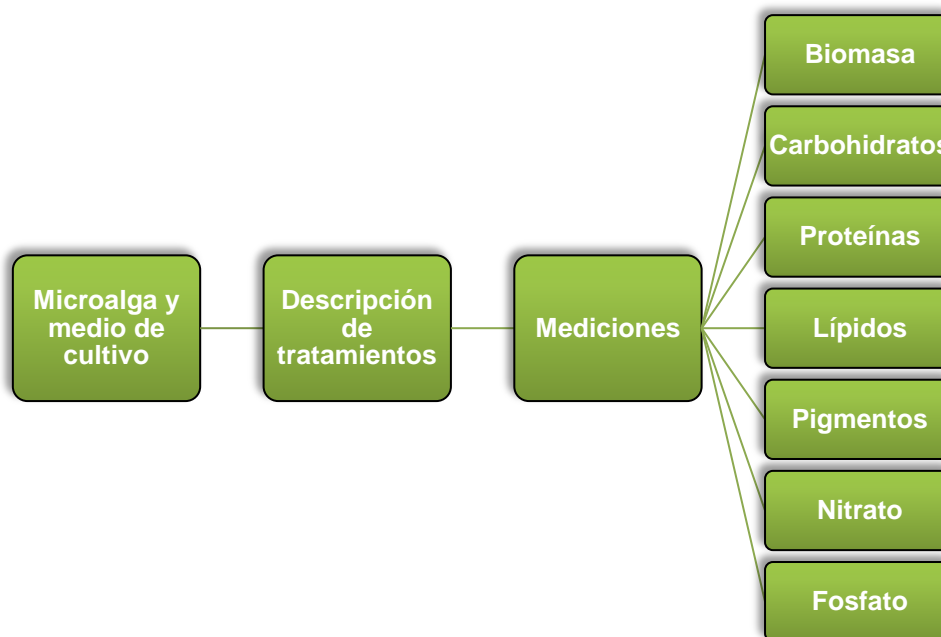
maximizar así, el valor derivado de la materia prima biológica (Fatih Demirbas, 2009).

Muchas algas tienen la capacidad de aprovechar sustratos orgánicos para la biosíntesis y mantenimiento celular, y no están restringidas por procesos fotosintéticos; por tanto, la adición de ciertos compuestos de este tipo, puede suministrar la energía adicional necesaria en situaciones de limitación de luz (Martínez, 1997). La incorporación de estos nutrientes, constituyen lo que se conoce como cultivos mixotróficos que combinan la habilidad metabólica heterótrofa y autótrofa de las microalgas (Xiong *et al.*, 2010). Estudios sobre el crecimiento mixotrófico se han enfocado en algas verdes como *C. vulgaris* (Liu *et al.*, 2009) debido a que éstas han demostrado la capacidad de oxidar y utilizar el acetato como fuente de carbono para su crecimiento en la oscuridad (Merrett & Syrett, 1960). Adicionalmente, se ha determinado que su metabolismo incrementa, debido a una alta incorporación de carbono orgánico a partir del acetato dentro de las células, llevando así a la formación de lípidos, polisacáridos y proteínas (Syrett *et al.*, 1964). Según Huppe & Turpin (1994), la variación en la concentración de carbono y nitrógeno puede incrementar la productividad de ciertos componentes generados por el alga.

Aunque los cambios físico-químicos inciden considerablemente en la producción de metabolitos, no se ha determinado a profundidad la influencia de parámetros como el tiempo sobre la misma. Por tanto, este trabajo se enfoca en evaluar las condiciones óptimas para el cultivo, la incidencia del tiempo en la productividad de proteínas, lípidos, pigmentos y carbohidratos, así como la velocidad de consumo de nitrógeno y fósforo en la microalga *C. vulgaris* UTEX 1803.

1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Figura 1. Descripción metodológica del proceso.



1.1 MICROALGA Y MEDIO DE CULTIVO

La microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 fue adquirida de la colección de cepas proveniente de la Universidad de Texas por un costo de \$2'000.000, 500ml (Austin, Texas, USA); se cultivó en medio Bold Basal, cuya composición en g/l es: NaNO_3 ($2,94 \times 10^{-3}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,04 \times 10^{-4}$), NaCl ($4,28 \times 10^{-4}$), K_2HPO_4 ($4,31 \times 10^{-4}$), KH_2PO_4 ($1,29 \times 10^{-3}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,70 \times 10^{-4}$) y micronutrientes (g/l) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,07 \times 10^{-5}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($7,28 \times 10^{-6}$), MoO_3 ($4,93 \times 10^{-6}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,29 \times 10^{-6}$), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,68 \times 10^{-6}$), H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-4}$), EDTA ($1,71 \times 10^{-4}$), KOH ($5,53 \times 10^{-4}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-5}$).

1.2 DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTOS

Se realizó el montaje de nueve tratamientos con su respectivo duplicado, a diferentes concentraciones de acetato y nitrato de sodio representadas en milimoles (mM) (tabla 1), como reactores se usaron botellas plásticas transparentes de 2,5l con diámetro interno de 14cm y 35cm de altura, se trabajó un volumen del cultivo de 2l. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con el fin de mejorar la homogeneidad de todo el cultivo. Las condiciones de operación fueron: temperatura entre 20°C y 25°C, pH neutro y ciclo luz-oscuridad 12:12h.

Tabla 1. Concentraciones de nitrato y acetato para los nueve tratamientos.

| NUTRIENTE/TRATAMIENTO | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| NITRATO DE SODIO (mM) | 1,03 | 1,03 | 1,03 | 1,47 | 1,47 | 1,47 | 2,94 | 2,94 | 2,94 |
| ACETATO DE SODIO (mM) | 5 | 10 | 20 | 5 | 10 | 20 | 5 | 10 | 20 |

1.3 MEDICIONES

Se realizaron mediciones a los nueve tratamientos, durante los días 0, 5, 10, 15, de cultivo, con el fin de cuantificar tanto la producción de metabolitos como el consumo de nitrato y fosfato durante este tiempo.

1.3.1 Cuantificación de Biomasa

Para determinar la concentración de biomasa se tomaron 5ml de cada uno de los tratamientos durante los días 0, 5, 10 y 15 del cultivo y posteriormente, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 500nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck) a las 9am (fase oscuridad) y 4pm (fase luz). La densidad óptica (DO) fue correlacionada con la cantidad de biomasa (g/l) de

acuerdo a la ecuación de calibración que se determinó a partir de biomasa seca en el laboratorio:

$$C_B(g/l) = 1,316 * (DO)_{500} + 0,173 \quad (1)$$

1.3.2 Determinación de Carbohidratos

Para llevar a cabo este proceso, se implementó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), con el fin de determinar los diferentes monosacáridos presentes en la muestra. Para la ejecución del método, se tomó 1ml de muestra de cada uno de los tratamientos, se centrifugó a 3400 rpm en una centrífuga (DYNAC) durante 20 minutos, con el fin de separar la biomasa del medio. Posteriormente se adicionaron 10ml de etanol para extraer el pigmento presente en la muestra y evitar así el posible ruido generado por la clorofila. Luego se calentó a 25°C al baño maría durante 10 minutos y se centrifugó nuevamente a las condiciones anteriormente mencionadas. Tras la segunda centrifugación se obtuvo biomasa libre de pigmentos como precipitado y extracto de pigmentos como sobrenadante. Se adicionaron 0,3 g de carbón activado para eliminar el color de los pigmentos presentes en el sobrenadante, evitando así una alteración en la medición, adicionalmente se agitó y se filtró. Se tomó tanto el precipitado, como 1ml del filtrado incoloro y se les adicionaron 5ml de ácido sulfúrico de 95-97% y 1ml de fenol al 5%. Para finalizar, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck) a longitudes de onda de 480nm para identificar Xilosa y 490nm para Glucosa. Los blancos usados para esta medición fueron ácido sulfúrico-fenol para el precipitado y fenol-etanol-ácido sulfúrico para el sobrenadante.

1.3.3 Determinación de Proteínas totales

Para determinar la cantidad de proteínas totales producidas, se partió del procedimiento descrito por Illman *et al.* (2000). Se tomaron 10ml de muestra de cada uno de los tratamientos, se centrifugó a 3400 rpm en una centrífuga

(DYNAC) durante 20 minutos, luego se agregó 1ml de solución de NaOH 1M y se centrifugó nuevamente a las condiciones anteriormente mencionadas. Posteriormente se aplicó el método de Biuret, planteado por Dorey & Draves (1998), se tomó el sobrenadante y se añadieron 5ml del reactivo biuret, transcurridos 20 minutos se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck), el blanco usado fue biuret-NaOH. Se realizó una curva de calibración partiendo de una preparación de ovoalbúmina con una concentración máxima de 2 g/l.

1.3.4 Determinación de Lípidos por extracción

La extracción lipídica se realizó siguiendo el protocolo soxhlet a base de hexano, modificado por el centro de investigación para el desarrollo sostenible en industria y energía (CIDES) de la Universidad Industrial de Santander (González, 2010). Para llevar a cabo este procedimiento, se secaron 10g de biomasa, durante un periodo de 12h a 200°C, después se homogenizó la biomasa usando un mortero y se llevó al horno durante 3h a una temperatura de 125°C. Finalmente, se pesaron 5g de dicha biomasa y se envolvieron en papel de filtro (tamaño de poro de 90mm), este montaje ingresó al soxhlet y permaneció allí durante 16h, tiempo requerido para lograr una adecuada extracción.

1.3.5 Determinación de Pigmentos

Para realizar este proceso se tomaron 10ml de muestra de cada uno de los tratamientos, se centrifugó a 3400 rpm en una centrífuga (DYNAC) durante 20 minutos, luego se agregó a la biomasa decantada un volumen de 3ml de etanol al 95% y se calentó al baño maría durante 10 minutos a 100°C. Posteriormente se aforó hasta 5ml con etanol al 95% y se centrifugó nuevamente a las condiciones anteriormente mencionadas, con el fin de eliminar la biomasa libre de pigmento. Finalmente, se usó el método espectrofotométrico propuesto por Wiley & Sons (2005) para cuantificar clorofila a (C_a) y clorofila b (C_b). Siguiendo la metodología,

se midió la absorbancia a longitudes de onda de 664nm y 649nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck) y se aplicaron las siguientes ecuaciones propuestas por los autores anteriormente mencionados.

Etanol:

$$c_a (\mu g/ml) = 13,36A_{664,1} - 5,19A_{648,6} \quad (2)$$

$$c_b (\mu g/ml) = 27,43A_{648,6} - 8,12A_{664,1} \quad (3)$$

1.3.6 Consumo de Nitrato (NO₃-N)

Para determinar la cantidad de nitrógeno consumido, se utilizó como referencia el método espectrofotométrico propuesto por Clesceri *et al.* (1999). Se tomaron 50ml de muestra de cada uno de los tratamientos, se centrifugó a 3400 rpm en una centrífuga (DYNAC) durante 20 minutos para separar la biomasa del medio y se adicionó 1ml de solución de HCL 1N, luego se agitó durante 1 min y se dejó reaccionar durante 10 minutos. Para finalizar se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck) a longitudes de onda de 220nm y 275nm, estos valores fueron remplazados en la ecuación 4. El blanco usado para esta medición fue el mismo volumen de muestra-agua destilada.

$$valor\ corregido = (2 \times \lambda_{275}) - \lambda_{220} \quad (4)$$

1.3.7 Consumo de Fosfato (PO₄-P)

Para llevar a cabo el procedimiento, se implementó el proceso descrito en el libro métodos estándar para la determinación de aguas residuales (Clesceri *et al.*, 1999), siguiendo el protocolo se tomaron 30ml de muestra de cada uno de los tratamientos, se centrifugó a 3400 rpm en una centrífuga (DYNAC) durante 20 minutos. Posteriormente se adicionaron 10ml de metavanadato molibdato y 10ml de agua destilada para obtener un volumen de 50ml. Para finalizar, se midió la

absorbancia en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck) a una longitud de onda de 470nm. El blanco usado para esta medición fue metavanadato molibdato-agua destilada.

1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

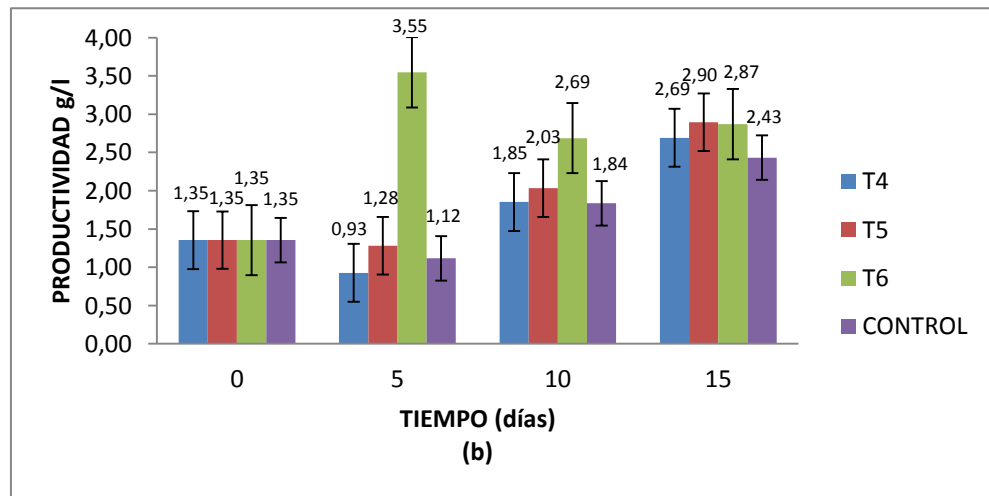
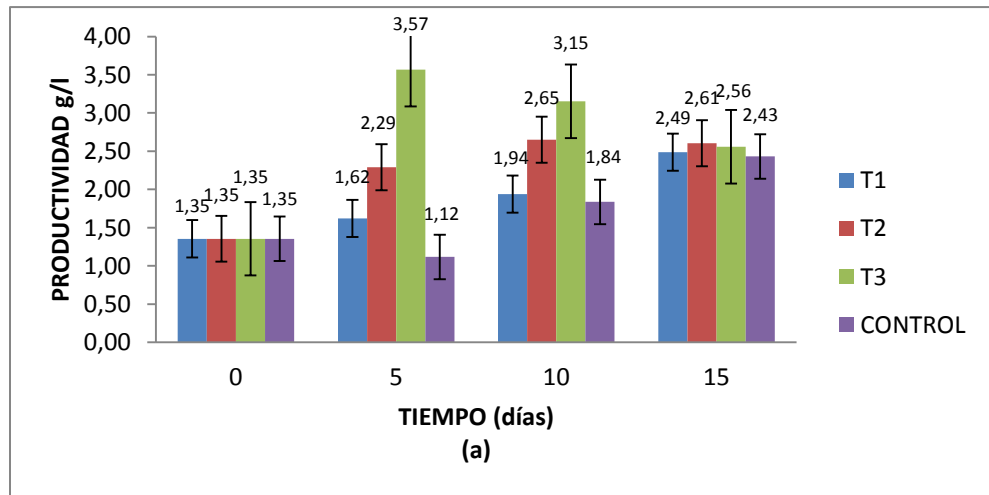
Se realizaron ensayos a priori de normalidad y homogeneidad de varianzas, según las pruebas de kolmogorov Smirnof y Levene, respectivamente (Zar, 1999) en el programa STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc. 1984-2007). Los resultados se analizaron utilizando el método de varianza (Anova Factorial), donde se determinó la relación existente entre el tiempo, las concentraciones de nitrato-acetato y la productividad de biomasa y los diferentes metabolitos, con un nivel de significancia del 95%.

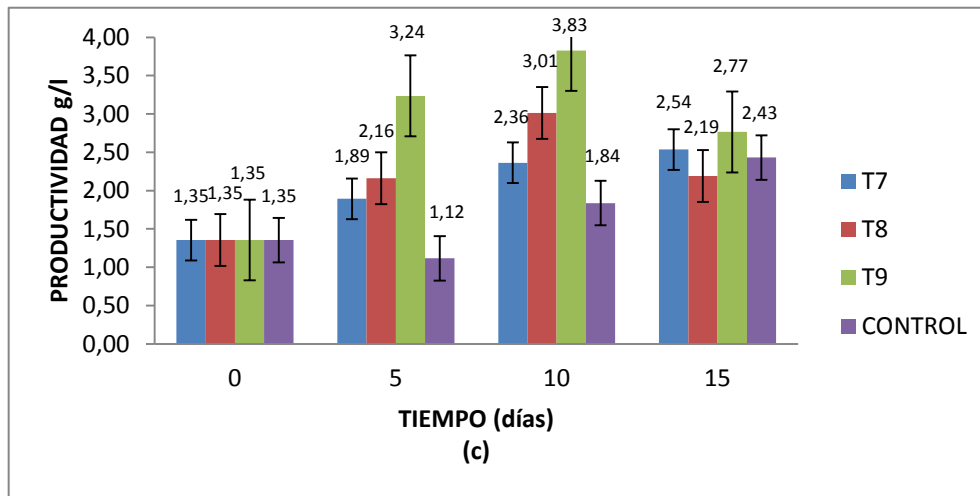
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

2.1 PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y ACETATO.

La figura 2 (a, b, c) muestra la productividad de biomasa en función del tiempo para los mejores tratamientos. En los primeros 5 días de cultivo los tratamientos T₃ (1,03mM nitrato y 20mM acetato) y T₆ (1,47mM nitrato y 20mM acetato) obtuvieron los valores más altos de productividad de biomasa (3,5700g/l y 3,5500g/l respectivamente), demostrando que es posible obtener la mayor cantidad durante la fase de crecimiento exponencial celular; sin embargo, el tratamiento T₉ (2,94mM nitrato y 20mM acetato) obtuvo la mayor productividad total (3,8300g/l de biomasa) al transcurso de los 10 días de cultivo; esta diferencia se debe a la cantidad de nitrógeno presente en los tratamientos, porque además de tener la misma concentración de acetato, la concentración de nitrógeno aparentemente está afectando la productividad de biomasa en el tiempo.

Figura 2. Productividad de biomasa en función del tiempo a diferentes concentraciones de acetato y nitrato **(a)** T₁ (1,03mM nitrato y 5mM acetato); T₂ (1,03mM nitrato y 10mM acetato); T₃ (1,03mM nitrato y 20mM acetato); control (2,94mM nitrato y 0mM acetato), **(b)** T₄ (1,47mM nitrato y 5mM acetato); T₅ (1,47mM nitrato y 10mM acetato); T₆ (1,47mM nitrato y 20mM acetato); control (2,94mM nitrato y 0mM acetato), **(c)** T₇ (2,94mM nitrato y 5mM acetato); T₈ (2,94mM nitrato y 10mM acetato); T₉ (2,94mM nitrato y 20mM acetato); control (2,94mM nitrato y 0mM acetato)





A partir de los resultados, se obtiene que la productividad de biomasa se encuentra fuertemente ligada con la concentración de acetato, por tanto a mayores concentraciones en la fuente de carbono, mayor es la producción de biomasa ($p=0,0334$). Por otra parte, debido a que la interacción entre el tiempo y la productividad reporta diferencias significativas ($p=0,0000$), es posible afirmar que la formación de biomasa varía con el tiempo. Otro factor que incide en la cantidad de biomasa producida es la relación carbono/nitrógeno, para el día 5, presenta diferencias significativas ($p=0,0430$), mientras que para los días 10 ($p=0,9288$) y 15 ($p=0,0798$) no reporta variaciones, permitiendo asegurar que es posible obtener mayores concentraciones de biomasa durante los primeros 10 días de cultivo.

2.2 PRODUCTIVIDAD DE CARBOHIDRATOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y ACETATO.

La tabla 2 resume la producción de carbohidratos en función del tiempo, en donde se destacan las mayores productividades: T_5 (1,47mM nitrato y 10mM acetato) al día 5, T_7 (2,94 mM nitrato y 5mM acetato) al día 10 y T_3 (1,03mM nitrato y 20mM acetato) al día 15. Los resultados estadísticos muestran que la productividad de

carbohidratos (tanto glucosa como xilosa) varía significativamente los días 5 ($p=0,0014$) y 15 ($p=0,0067$), esto se debe principalmente al estrés celular ejercido por la relación carbono/nitrógeno; sin embargo al día 10 no ocurren variaciones significativas ($p=0,2165$).

Tabla 2. Productividad de Carbohidratos(g/l) en función del tiempo para los nueve tratamientos.

| TRATAMIENTO | TIEMPO (días) | | | |
|----------------------|---------------|--------|--------|--------|
| | 0 | 5 | 10 | 15 |
| T1 | 0,0303 | 0,0249 | 0,0679 | 0,0276 |
| T2 | 0,0303 | 0,0113 | 0,0208 | 0,0450 |
| T3 | 0,0303 | 0,0313 | 0,0544 | 0,0939 |
| T4 | 0,0303 | 0,0617 | 0,0359 | 0,0245 |
| T5 | 0,0303 | 0,0928 | 0,0359 | 0,0426 |
| T6 | 0,0303 | 0,0585 | 0,0716 | 0,0412 |
| T7 | 0,0303 | 0,0319 | 0,0730 | 0,0305 |
| T8 | 0,0303 | 0,0479 | 0,0515 | 0,0471 |
| T9 | 0,0303 | 0,0571 | 0,0553 | 0,0449 |
| CONTROL | 0,0303 | 0,1607 | 0,0452 | 0,0536 |
| VALOR ESTADÍSTICO(p) | - | 0,0014 | 0,2165 | 0,0067 |

Analizando la productividad de carbohidratos a través del tiempo (tabla 3), se puede apreciar que para el tratamiento T₅ se obtiene una producción de carbohidratos de 0,0928g/l al día 5, correspondiente al 7% del total de la biomasa y para T₃ al día 15, se obtiene 0,0939g/l, lo cual representa la producción más alta, sin embargo esto solo corresponde al 4% de la biomasa total, esta variación en el porcentaje se debe a cambios en la composición de la biomasa durante el tiempo de cultivo. Por otro lado, los tratamientos menos productivos son T₂ (1,03mM nitrato y 10mM acetato) y T₈ (2,94mM nitrato y 10mM acetato), con solo el 2% de la biomasa total. Como se observa en los resultados, la concentración de acetato está relacionada con la producción de carbohidratos, permitiendo afirmar que altas concentraciones de dicho nutriente (20mM), incrementan la productividad de este metabolito con el tiempo ($p=0,0000$), lo que concuerda con estudios realizados por

Chinnasamy *et al.* (2009) y Laliberté (1993), quien plantea además que las elevadas concentraciones de acetato, promueven la síntesis de clorofila y la producción de lípidos.

Tabla 3. Cantidad porcentual de Carbohidratos en la biomasa.

| TRATAMIENTO | DÍA | BIOMASA g/l | CARBOHIDRATOS g/l | CARBOHIDRATOS % |
|-------------|-----|-------------|-------------------|-----------------|
| T3 | 15 | 2,5600 | 0,0939 | 4 |
| T5 | 5 | 1,2813 | 0,0928 | 7 |
| T2 | 15 | 2,6059 | 0,0450 | 2 |
| T8 | 10 | 3,0115 | 0,0515 | 2 |
| CONTROL | 5 | 1,1173 | 0,1607 | 14 |

La distribución de carbohidratos en función de la cantidad de xilosa y glucosa cuantificada tanto en la biomasa como en el extracto de pigmentos para los tratamientos más productivos se muestra en la tabla 4. Según la tesis de carbohidratos escrita por Rueda & Alfonso (2012), durante la extracción de pigmentos, es posible solubilizar una cantidad considerable de carbohidratos, debido a que la relación carbono/nitrógeno puede aumentar la deposición de estos dentro de los pirenoides.

En la tabla 4 se observa que las concentraciones más altas de xilosa para los tratamientos T₃ y T₅ se encuentran presentes en la biomasa; sin embargo para el tratamiento T₇ está distribuida entre el extracto y la biomasa en partes iguales. En el caso de la glucosa, las mayores concentraciones para los tratamientos T₃ T₅ y T₇ se encuentran presentes en la biomasa.

Tabla 4. Concentración de Xilosa y Glucosa (g/l) en la biomasa y el extracto de pigmentos.

| TRATAMIENTO | T3 | | | T5 | | | T7 | | | CONTROL | | | |
|-------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|
| DÍA | 5 | 10 | 15 | 5 | 10 | 15 | 5 | 10 | 15 | 5 | 10 | 15 | |
| XILOSA | PIGMENTOS | 0,0009 | 0,0081 | 0,0535 | 0,0734 | 0,0059 | 0,0041 | 0,0164 | 0,0455 | 0,0041 | 0,1354 | 0,0048 | 0,0091 |
| | BIOMASA | 0,0159 | 0,0176 | 0,0184 | 0,0094 | 0,0158 | 0,0171 | 0,0110 | 0,0124 | 0,0131 | 0,0136 | 0,0377 | 0,0173 |
| GLUCOSA | PIGMENTOS | 0,0001 | 0,0071 | 0,0014 | 0,0024 | 0,0020 | 0,0001 | 0,0012 | 0,0071 | 0,0047 | 0,0051 | 0,0003 | 0,0084 |
| | BIOMASA | 0,0144 | 0,0215 | 0,0206 | 0,0077 | 0,0121 | 0,0212 | 0,0033 | 0,0080 | 0,0085 | 0,0066 | 0,0023 | 0,0187 |

El fósforo juega un papel importante en la mayoría de procesos celulares, especialmente los que están implicados en la generación y transformación de energía metabólica, por lo que es indispensable para el crecimiento y reproducción de las microalgas (Stewart, 1974). Aunque no existe una relación directa entre la cantidad de fósforo consumido y la producción de carbohidratos, se puede apreciar en la tabla 5, que dicho nutriente presenta cambios entre los días 5 y 15 ($p=0,0000$), para el caso del nitrógeno se aprecian variaciones significativas entre los días 0 y 10 ($p=0,0000$) del cultivo.

Tabla 5. Productividad de Carbohidratos en función del porcentaje de nitrógeno y fósforo consumido.

| TRATAMIENTO | PRODUCTIVIDAD CARBOHIDRATOS g/l | | | | | | | | |
|-------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|
| | DÍA 5 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] | DÍA 10 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] | DÍA 15 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] |
| T3 | 0,0313 | 95% | 22% | 0,0544 | 97% | 32% | 0,0939 | 97% | 35% |
| T5 | 0,0928 | 91% | 31% | 0,0359 | 93% | 36% | 0,0426 | 94% | 36% |
| T7 | 0,0319 | 93% | 28% | 0,0730 | 94% | 44% | 0,0305 | 99% | 44% |
| CONTROL | 0,1607 | 79% | 21% | 0,0452 | 79% | 31% | 0,0536 | 79% | 31% |

2.3 PRODUCTIVIDAD DE PROTEÍNAS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y ACETATO.

La productividad de proteínas en función del tiempo para los nueve tratamientos se muestra en la tabla 6, se destacan por tener los mayores valores: T₁ (1,03mM nitrato y 5mM acetato), T₂ (1,03mM nitrato y 10 mM acetato) en el día 5 y T₈ (2,94mM nitrato y 10mM acetato) en el día 15. Resultados estadísticos muestran que la productividad de proteínas varía significativamente el día 5 ($p=0,0001$), por tanto se puede afirmar que la relación carbono/nitrógeno incide solamente hasta este día de cultivo.

Tabla 6. Productividad de Proteínas en función del tiempo para los nueve tratamientos.

| TRATAMIENTO | TIEMPO (días) | | | |
|-----------------------|---------------|--------|--------|--------|
| | 0 | 5 | 10 | 15 |
| T1 | 0,1356 | 0,4646 | 0,1115 | 0,2712 |
| T2 | 0,1356 | 0,5153 | 0,1957 | 0,3567 |
| T3 | 0,1356 | 0,3337 | 0,1484 | 0,1308 |
| T4 | 0,1356 | 0,1650 | 0,2791 | 0,2831 |
| T5 | 0,1356 | 0,1115 | 0,2975 | 0,1504 |
| T6 | 0,1356 | 0,3970 | 0,3143 | 0,1863 |
| T7 | 0,1356 | 0,1926 | 0,0604 | 0,3197 |
| T8 | 0,1356 | 0,1877 | 0,1145 | 0,5644 |
| T9 | 0,1356 | 0,4142 | 0,0131 | 0,0793 |
| CONTROL | 0,1356 | 0,5886 | 0,2375 | 0,3353 |
| VALOR ESTADÍSTICO (p) | - | 0,0001 | 0,7402 | 0,0689 |

Durante los 5 primeros días del cultivo, T₂ produce 0,5153g/l de proteínas, lo que corresponde al 23% del total de la biomasa (tabla 7), por otra parte, el tratamiento T₈ posee 0,5644g/l, siendo el valor más alto de productividad (26% de la biomasa). Sin embargo, al comparar los resultados con el tratamiento control (2,94mM nitrato y 0mM acetato) el cual produce 0,5886g/l de proteínas (53% de la biomasa total), se puede apreciar que el contenido de nitrógeno en forma de nitrato en el medio

(mayor concentración) y no la fuente de carbono (en forma de acetato), afecta positivamente la producción de este metabolito durante el tiempo de cultivo de *C. vulgaris* ($p=0,0000$), estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fábregas *et al.* (1989). Cabe mencionar que la deficiencia de nitrógeno influye sobre otros aspectos de la fisiología celular, incluyendo, una disminución en la cantidad de clorofila, afectando así la habilidad de las células para realizar fotosíntesis, resultados que se reflejan en el déficit de la tasa de crecimiento microalgal (Ördög *et al.*, 2011). Del mismo modo, Farrill *et al.* (2003) encontraron que incubando células en un medio libre de nitrógeno durante 6 días, el contenido de proteínas totales y solubles se reducía sustancialmente.

Tabla 7. Cantidad porcentual de Proteínas en la biomasa.

| TRATAMIENTO | DÍA | BIOMASA g/l | PROTEÍNAS g/l | % PROTEÍNAS |
|-------------|-----|-------------|---------------|-------------|
| T2 | 5 | 2,2900 | 0,5153 | 23 |
| T8 | 15 | 2,1899 | 0,5644 | 26 |
| T5 | 10 | 2,0331 | 0,2975 | 15 |
| T4 | 10 | 1,8519 | 0,2791 | 15 |
| CONTROL | 5 | 1,1173 | 0,5886 | 53 |

El consumo de nitrógeno juega un papel fundamental en el incremento o disminución de la productividad de proteínas; a nivel bioquímico el déficit de este nutriente influye directamente en la formación de aminoácidos y a su vez limita la traslación del mRNA, reduciendo la síntesis de proteínas (Barsanti & Gualtieri, 2006). La tabla 8, muestra que el tratamiento con mayor productividad de dicho metabolito (T_8) consume significativamente el nitrato presente en el cultivo (de 94% a 99%) entre los días 10 y 15 ($p=0,0020$).

Tabla 8. Productividad de Proteínas en función del porcentaje de nitrógeno y fósforo consumido.

| PRODUCTIVIDAD PROTEÍNAS g/l | | | | | | | | | |
|-----------------------------|--------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|
| TRATAMIENTO | DÍA 5 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] | DÍA 10 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] | DÍA 15 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] |
| T1 | 0,4646 | 88% | 25% | 0,1115 | 90% | 38% | 0,2712 | 91% | 38% |
| T2 | 0,5153 | 86% | 21% | 0,1957 | 91% | 37% | 0,3567 | 91% | 37% |
| T8 | 0,1877 | 93% | 28% | 0,1145 | 94% | 35% | 0,5644 | 99% | 35% |
| CONTROL | 0,5886 | 79% | 21% | 0,2375 | 79% | 31% | 0,3353 | 79% | 31% |

2.4 PRODUCTIVIDAD DE PIGMENTOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y ACETATO.

A continuación se muestra la productividad de pigmentos en función del tiempo para los nueve tratamientos (tabla 9); se puede apreciar que T₁ (1,03mM nitrato y 5mM acetato), T₄ (1,47mM nitrato y 5mM de acetato), y T₅ (1,47mM nitrato y 10mM acetato) en el día 15, se destacan por ser los tratamientos con la mayor productividad de este metabolito. Resultados estadísticos reportan diferencias significativas en la producción de pigmentos el día 15 ($p=0,0308$), debido al efecto ejercido por la relación carbono/nitrógeno.

Tabla 9. Productividad de Pigmentos en función del tiempo para los nueve tratamientos.

| TRATAMIENTO | TIEMPO (días) | | | |
|-----------------------|---------------|--------|--------|--------|
| | 0 | 5 | 10 | 15 |
| T1 | 0,0016 | 0,0290 | 0,0500 | 0,0762 |
| T2 | 0,0016 | 0,0277 | 0,0398 | 0,0473 |
| T3 | 0,0016 | 0,0236 | 0,0416 | 0,0454 |
| T4 | 0,0016 | 0,0413 | 0,0497 | 0,0725 |
| T5 | 0,0016 | 0,0392 | 0,0462 | 0,0907 |
| T6 | 0,0016 | 0,0268 | 0,0400 | 0,0364 |
| T7 | 0,0016 | 0,0411 | 0,0407 | 0,0639 |
| T8 | 0,0016 | 0,0328 | 0,0464 | 0,0463 |
| T9 | 0,0016 | 0,0232 | 0,0353 | 0,0691 |
| CONTROL | 0,0016 | 0,0328 | 0,0598 | 0,1215 |
| VALOR ESTADÍSTICO (p) | - | 0,4489 | 0,7348 | 0,0308 |

Un análisis en la productividad de pigmentos permite establecer que los tratamientos T₁ y T₅ generan la mayor producción de este metabolito (0,0762g/l y 0,0907g/l respectivamente). En la tabla 10 se aprecia que la productividad alcanzada por T₁ corresponde al 3% de la biomasa total y para T₅ representa el 3%, comparando lo anterior con los tratamientos con menores productividades (T₆: 1,47mM nitrato y 20mM acetato; T₈: 2,94mM nitrato y 10mM acetato), para el día 15, se observa que para el caso de T₈ un valor de 0,0463g/l de pigmentos solo constituye el 2% de la biomasa total y para T₆ con una productividad de 0,0364g/l de pigmentos, el porcentaje disminuye considerablemente hasta 1%. La disminución en la productividad ocurre porque las células no solo obtienen energía y carbono de la fotosíntesis del CO₂ presente en el aire, sino de la fosforilación oxidativa del acetato (Sansawa & Endo, 2004), vale la pena mencionar, que una fuente de carbono diferente a CO₂ puede causar una disminución en la tasa fotosintética de la célula afectando así la productividad de pigmentos (Yang *et al.*, 2000).

De los resultados anteriores se puede afirmar que los cultivos con bajas concentraciones de acetato reportan valores de productividad más altos y muestran mayor actividad fotosintética al día 15, lo cual concuerda con los experimentos efectuados por Syrett *et al.* (1963), dichas prácticas consistían en realizar montajes de cultivos mixotróficos en ambientes libres de CO₂ con el fin de regular la síntesis celular de clorofila para ahorrar energía.

Tabla 10. Cantidad porcentual de Pigmentos en la biomasa.

| TRATAMIENTO | DÍA | BIOMASA g/l | PIGMENTOS g/l | % PIGMENTOS |
|-------------|-----|-------------|---------------|-------------|
| T1 | 15 | 2,4860 | 0,0762 | 3 |
| T5 | 15 | 2,8952 | 0,0907 | 3 |
| T6 | 15 | 2,8700 | 0,0364 | 1 |
| T8 | 15 | 2,1899 | 0,0463 | 2 |
| CONTROL | 15 | 2,4310 | 0,1215 | 5 |

La clorofila es el mecanismo fotosintético más importante en algas verdes, pues se encarga de tomar la energía solar y el CO₂ para generar el flujo metabólico en el crecimiento celular y acumulación de diferentes metabolitos (Ördög *et al.*, 2011). Las células acumulan grandes cantidades de moléculas de clorofila cuando la fuente de nitrógeno se encuentra altamente disponible. Entonces, cuando se agotan las fuentes externas de nitrógeno, las células comienzan a utilizar la clorofila como una fuente de nitrógeno intracelular (Bidigare, 1993). Como se puede observar en la tabla 11, la mayor parte del nitrato disponible en el cultivo, es consumido durante los primeros 5 días y posteriormente *C. vulgaris*, utiliza la clorofila como fuente externa de nitrógeno, permitiendo alcanzar una alta productividad de pigmentos hacia el día 15.

Tabla 11. Productividad de Pigmentos en función del porcentaje de nitrógeno y fósforo consumido.

| PRODUCTIVIDAD PIGMENTOS g/l | | | | | | | | | |
|-----------------------------|--------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|
| TRATAMIENTO | DÍA 5 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] | DÍA 10 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] | DÍA 15 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] |
| T1 | 0,0290 | 88% | 25% | 0,0500 | 90% | 38% | 0,0762 | 91% | 38% |
| T4 | 0,0413 | 92% | 33% | 0,0497 | 94% | 40% | 0,0725 | 95% | 40% |
| T5 | 0,0392 | 91% | 31% | 0,0462 | 94% | 36% | 0,0907 | 94% | 36% |
| CONTROL | 0,0328 | 79% | 21% | 0,0598 | 79% | 31% | 0,1215 | 79% | 31% |

2.5 PRODUCTIVIDAD DE LÍPIDOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y ACETATO.

La tabla 12 resume la producción de lípidos en función del tiempo, en ella se destacan los tratamientos T₃ (1,03mM nitrato y 20mM acetato), T₇ (2,94mM nitrato y 5mM acetato) al día 10 y T₈ (2,94mM nitrato y 10mM acetato) al día 5 por poseer las mayores productividades de este metabolito. Resultados estadísticos muestran que la productividad de lípidos varía significativamente los días 5

($p=0,0000$), 10 ($p=0,0001$) y 15 ($p=0,0014$) debido al efecto ejercido por la relación carbono/nitrógeno.

Tabla 12. Productividad de Lípidos en función del tiempo para los nueve tratamientos.

| TRATAMIENTO | TIEMPO (días) | | | |
|-----------------------|---------------|--------|--------|--------|
| | 0 | 5 | 10 | 15 |
| T1 | 0,0140 | 0,0599 | 0,0049 | 0,0225 |
| T2 | 0,0140 | 0,0035 | 0,0085 | 0,2034 |
| T3 | 0,0140 | 0,0318 | 0,2403 | 0,0143 |
| T4 | 0,0140 | 0,0018 | 0,0169 | 0,0183 |
| T5 | 0,0140 | 0,1685 | 0,0016 | 0,0041 |
| T6 | 0,0140 | 0,0332 | 0,0113 | 0,0088 |
| T7 | 0,0140 | 0,0059 | 0,5003 | 0,0010 |
| T8 | 0,0140 | 0,3018 | 0,0148 | 0,0053 |
| T9 | 0,0140 | 0,0204 | 0,0237 | 0,0169 |
| CONTROL | 0,0140 | 0,0270 | 0,0111 | 0,0497 |
| VALOR ESTADÍSTICO (p) | - | 0,0000 | 0,0001 | 0,0014 |

Microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica y la robustez del microorganismo, son relevantes para su selección (Chisti, 2007; Rosenberg et al., 2008). La determinación del contenido oleaginoso de las microalgas resulta complicada a causa de su variación ante condiciones distintas de cultivo; el crecimiento en ambientes desfavorables o bajo situaciones de estrés, frecuentemente conlleva al incremento de la fracción lipídica, aunque en detrimento de la productividad lipídica del cultivo. Los lípidos comprendidos en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 50% de su peso seco (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991).

Los lípidos transesterificables presentes en la biomasa, se midieron en base seca, con el fin de maximizar la eficiencia de la extracción (González, 2012). La tabla 13 muestra que los tratamientos T₇ (2,94mM nitrato y 5mM acetato) el día 10 y T₈

(2,94mM nitrato y 10mM acetato) el día 5, alcanzan la producción más alta de lípidos 0,5003g/l y 0,3018g/l respectivamente, para el caso de T₇, esta cantidad representa 21% de la biomasa total y en T₈, 14% de dicha biomasa. Comparando estos resultados con los de los tratamientos T₅ (1,47mM nitrato y 10mM acetato) y T₆(1,47mM nitrato y 20mM acetato) para el día 5, se observa que hay disminución en la productividad de lípidos 0,1685g/l correspondiente al 13% de la biomasa total para T₅ y 0,0332g/l referido al 1% de dicha biomasa para T₆, esto se debe al efecto ejercido por la relación carbono/nitrógeno.

Tabla 13. Cantidad porcentual de Lípidos en la biomasa.

| TRATAMIENTO | DÍA | BIOMASA g/l | LÍPIDOS g/l | % LÍPIDOS |
|-------------|-----|-------------|-------------|-----------|
| T7 | 10 | 2,3634 | 0,5003 | 21 |
| T8 | 5 | 2,1613 | 0,3018 | 14 |
| T5 | 5 | 1,2813 | 0,1685 | 13 |
| T6 | 5 | 3,5460 | 0,0332 | 1 |
| CONTROL | 15 | 2,4310 | 0,0497 | 2 |

La cantidad total de lípidos, así como la tipología de los ácidos grasos presentes, además de ser específica para cada especie de alga, está ligada a factores ambientales como la intensidad luminosa, pH, salinidad, temperatura, concentración de nitrógeno y otros nutrientes en el medio de cultivo (Alvarez Cobelas, 1989). En la tabla 14, se puede observar que la máxima cantidad de fosfato presente en el medio de cultivo, se consume entre los días 5 y 10, mientras que el nitrógeno no presenta cambios significativos. Por tanto se afirma que la concentración de fósforo se encuentra ligada con la productividad de lípidos, en el caso puntual de T₇ con una productividad máxima de (0,5003g/l), se aprecia que el cambio porcentual es significativo (de 28% a 44%) entre estos días.

Tabla 14. Productividad de Lípidos en función del porcentaje de nitrógeno y fósforo consumido.

| PRODUCTIVIDAD LÍPIDOS g/l | | | | | | | | | |
|---------------------------|--------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|
| TRATAMIENTO | DÍA 5 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] | DÍA 10 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] | DÍA 15 | [NO ₃ -N] | [PO ₄ -P] |
| T3 | 0,0318 | 95% | 22% | 0,2403 | 97% | 32% | 0,0143 | 97% | 35% |
| T7 | 0,0059 | 93% | 28% | 0,5003 | 94% | 44% | 0,0010 | 99% | 44% |
| T8 | 0,3018 | 93% | 28% | 0,0148 | 94% | 35% | 0,0053 | 99% | 35% |
| CONTROL | 0,0270 | 79% | 21% | 0,0111 | 79% | 31% | 0,0497 | 79% | 31% |

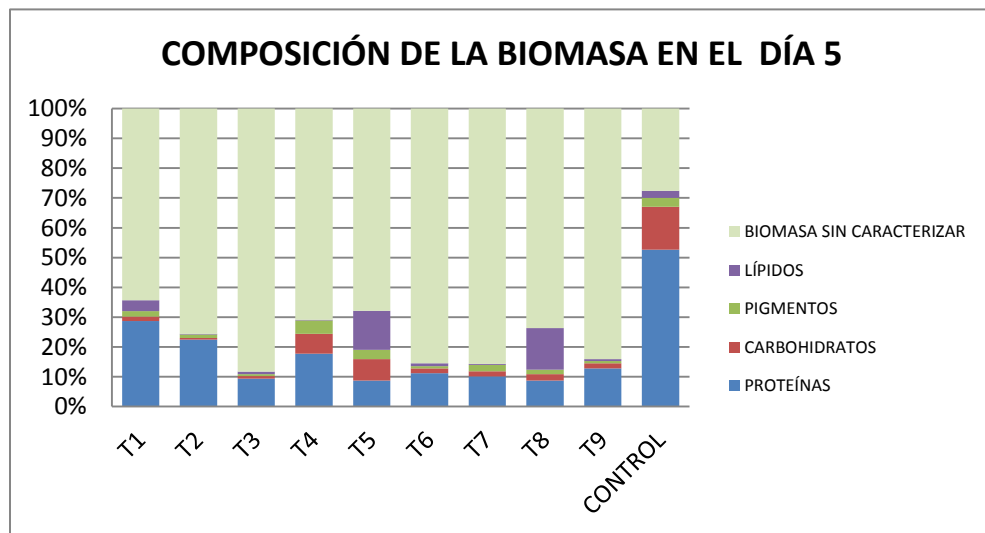
2.6 COMPOSICIÓN PORCENTUAL DE LA BIOMASA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.

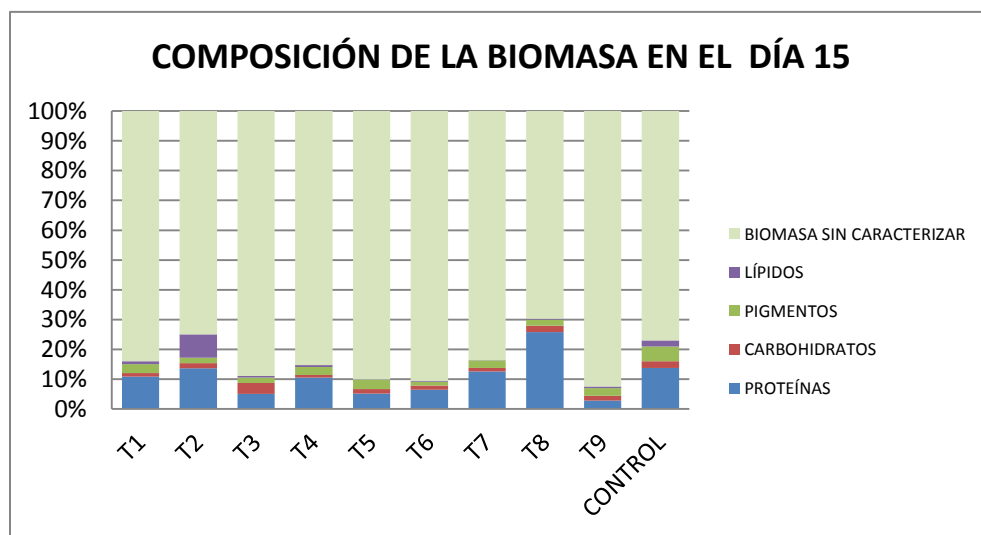
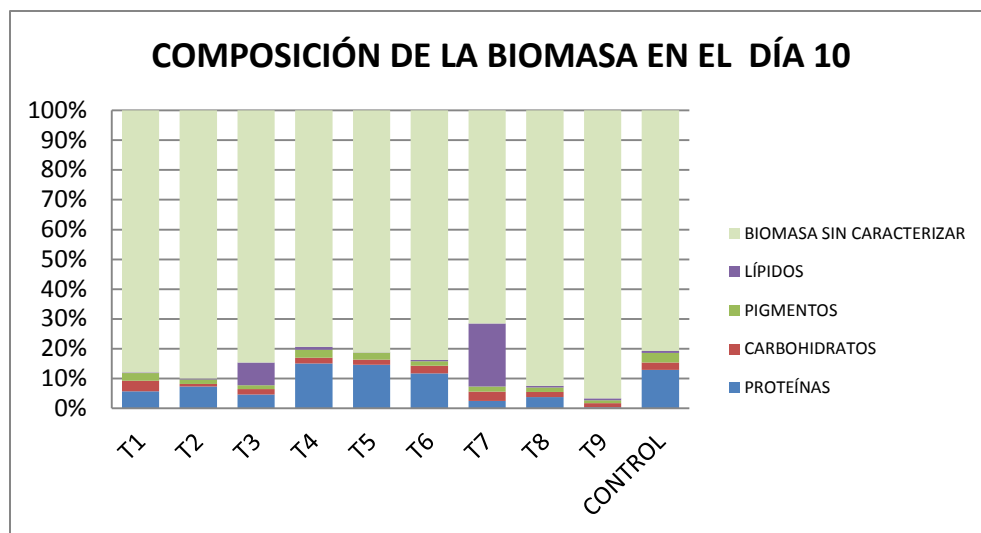
En las figuras 3a, 3b y 3c, se presenta la composición porcentual de carbohidratos, proteínas, lípidos, pigmentos y biomasa sin caracterizar durante el tiempo de cultivo (5, 10 y 15 días) para los nueve tratamientos. Por ser organismos unicelulares, la biomasa microalgal posee productos de interés, a diferencia de las plantas superiores en las que los productos recuperables se encuentran en sitios u órganos específicos lo que dificulta su extracción. Debido a esto, la inducción fisiológica para la producción de compuestos de alto valor comercial como proteínas, lípidos, glicerol, pigmentos, enzimas y biopolímeros es fácilmente realizable (Shin *et al.*, 1998), (Shinto *et al.*, 2008).

Una de las principales ventajas de implementar la relación carbono/nitrógeno, es el aumento significativo de la biomasa producida; al utilizar un medio de cultivo como *Bold basal* con una concentración celular inicial específica para *C. vulgaris* UTEX 1803, es posible obtener en 10 días 1,8400g/l de biomasa, en cambio al aplicar una relación entre la fuente de carbono y nitrógeno (tratamiento T₉), se obtienen 3,8900g/l lo cual representa un aumento de hasta 2 veces la cantidad de biomasa producida. Sin embargo, el hecho de modificar el medio, conlleva a cambiar drásticamente la proporción de los diferentes metabolitos celulares, es por esto que es posible separar los tratamientos propuestos y plantear escenarios de

producción de biomasa de microalgas con miras a la obtención de metabolitos de valor agregado; para el caso de los carbohidratos se tiene que T₃ produce hasta 0,0939g/l (4% de la biomasa total) al día 15 (Figura 3c) y el control hasta 0,1607g/l (14% de la biomasa total) en solo 5 días de cultivo (Figura 3a). La diferencia significativa entre los tratamientos, permite escoger como mejor escenario de producción al control; otro beneficio es el corto tiempo en el cual se metabolizan los carbohidratos (para este caso glucosa y xilosa) además de no necesitar una fuente de carbono orgánico como el acetato para obtener altas concentraciones de este metabolito.

Figura 3. (a) Composición porcentual de la biomasa en el día 5 de cultivo, **(b)** Composición porcentual de la biomasa en el día 10 de cultivo y **(c)** Composición porcentual de la biomasa en el día 15 de cultivo.





(c)

Para la producción de proteínas se tiene que con el tratamiento T_8 , al día 15 se obtienen 0,5644g/l (26% de la biomasa total), por otro lado el tratamiento control produce 0,5886g/l (53%) en solo 5 días. Al igual que para el caso de carbohidratos, la diferencia significativa entre los tratamientos, permite escoger como mejor escenario de producción al tratamiento control. A diferencia de carbohidratos y proteínas, la síntesis lipídica se ve fuertemente influenciada por la relación carbono/nitrógeno, permitiendo escoger como mejor tratamiento a T_7 , el cual alcanza un valor de 0,5003g/l al día 10; esta productividad corresponde al 21% de la biomasa total, representando un aumento de hasta 10 veces respecto al

control. Esta diferencia significativa permite elegir como mejor escenario de producción al tratamiento T₇; aunque a diferencia del escenario de carbohidratos y proteínas, este requiere un mayor tiempo de cultivo y una modificación en la concentración de carbono orgánico (5mM). Debido al bajo porcentaje que representan los pigmentos totales en la biomasa (hasta 5% en 15 días), es posible aprovechar este metabolito en cada uno de los escenarios escogidos.

Uno de los parámetros necesarios para la producción de biomasa en sistemas de cultivo semi-continuos, es la cantidad de nutrientes requeridos en cada lote de producción. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio y proponiendo el nitrato (NO₃-N) y fosfato (PO₄-P) como los nutrientes más influyentes en la producción tanto de biomasa como de cada uno de los metabolitos específicos (carbohidratos, proteínas, pigmentos y lípidos), el escenario para la obtención de carbohidratos y proteínas (control) requiere que cada 5 días se adicione 79% del nitrato y el 21% del fosfato inicial en el medio de cultivo, en cambio para la obtención de lípidos (T₇) es necesario adicionar cada 10 días 94% del nitrato y 44% del fosfato inicial. El acoplar escenarios de cultivo de microalgas, con un sistema de aprovechamiento como la biorefinería, permite valorizar la biomasa generada, debido a la presencia de otros metabolitos en menor proporción que pueden ser utilizados en las diferentes corrientes dentro del proceso.

CONCLUSIONES

1. Las modificaciones en el medio, generadas por la adición de concentraciones específicas de nitrato y acetato de sodio, además del tiempo de cultivo, permiten potencializar tanto la productividad de biomasa como la de metabolitos específicos; para el caso de estudio, el escenario T₉ produjo la mayor cantidad de biomasa reportada (3,8300g/l en 10 días), incrementando hasta dos veces la producción de biomasa respecto al control (1,8400g/l).
2. El mejor escenario para la obtención de carbohidratos (glucosa y xilosa) fue el control con una productividad de 0,1607g/l (correspondiente al 14% de la biomasa total) en 5 días de cultivo y un consumo de 79% del nitrato y el 21% del fosfato inicial en el medio.
3. Altas concentraciones en la fuente de nitrógeno (2,94mM) y la ausencia de una fuente de carbono orgánico, incrementan la productividad de proteínas en *C. vulgaris*; por tanto, es posible definir como mejor escenario al control, con una productividad de 0,5886g/l (correspondiente al 53% de la biomasa total) en 5 días de cultivo y un consumo de 79% del nitrato y el 21% del fosfato inicial en el medio.
4. Es posible aprovechar cada uno de los escenarios propuestos para la producción de pigmentos, debido al bajo porcentaje que representa este metabolito en la biomasa total obtenida (hasta 5%), durante los 15 días de cultivo.
5. El mejor escenario para la obtención de lípidos fue T₇, con una productividad de 0,5003g/l (correspondiente al 21% de la biomasa total, el cual representa un aumento de hasta 10 veces respecto al tratamiento control) en 10 días de cultivo y un consumo de 94% del nitrato y el 44% del fosfato inicial en el medio.

RECOMENDACIONES

En estudios posteriores, además de xilosa y glucosa, es recomendable cuantificar otros carbohidratos fermentables como manosa y arabinosa, que son fuentes alternativas para la producción de bioetanol, también es posible determinar el porcentaje de ceniza, la cantidad de lípidos totales, carotenoides, biopolímeros, enzimas, entre otros compuestos, que pueden estar presentes en la biomasa sin caracterizar, con el fin de diseñar sistemas integrales para el aprovechamiento y valorización de biomasa a partir de microalgas.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez Cobelas, M., Zarco Lechado, J. (1989). Lipids in microalgae. A review I. Biochemistry. *Grasas y Aceites*, Vol.40, fasc. 2: 118-145.

Ami, B.A. (2008). Bio-fuel production by marine microalgae conversion of electric power plant wastes to bio-diesel and bio-ethanol. *J. Biotechnol.* 136 (Supplement 1): S523.

Arredondo, B.O.& Vázquez-Duhalt, R. (1991) Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*, 17: 99-111.

Barsanti, L., Gualtieri. (2006). *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press. Disponible en la web <<http://es.scribd.com/doc/86777245/Algae-Anatomy-Biochemistry-And-Biotechnology-barsanti-L-Gualtieri>>. [Citado el 26 de junio 2012].

Becker, W. (2004). *Microalgae in human and animal nutrition*. Handbook of microalgal culture. In Richmond, A. (ed.). Blackwell: p. 312-351.

Belarbi, E.H, Molina, E., Chisti, Y. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Process Biochem.* 35:951-969.

Bidigare, RR., Ondrusek, M., Kennicutt, I., Harvey H., Hoham, R., Macko, S. (1993). Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *J. Phycol.* 29 (4):427-434.

Borowitzka, M. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Phycol.*7: 3-15.

Brennan, L., Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 557-577.

Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., Keshav C. (2009). Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 518-532.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel for microalgae. Research review paper. *Biotechnology advances* 25: 294-306.

Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. (1999). Standard methods for examination of water and wastewater. *American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF)*. 2: 1325 p.

De, B.K., Chaudhury, S. (1999). Effect of nitrogen sources on γ -linoleic acid accumulation in *Spirulina platensis*. *JAOCS* 76: 156.

Dorey, F., Draves, G. (1998). Quantitative analysis laboratory: A New Approach Funded by the National Science Foundation. *University of Central Arkansas*: 1-3.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3): 350–356.

Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C. (1989). Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentration as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*. 83: 289-304.

Fatih Demirbas, M. (2009). Biorefineries for biofuel Upgrading: A critical review. *Applied Energy* 86: S151-S161.

Farrill, N. E., Travieso, L., Benítez, F., Bécares, E., Romo, S., Borja, R., Weiland, P. and Sánchez, E. (2003). Population dynamic of algae and bacteria in an oxidation channel. *Journal of Environmental Science and Health*. 38: 697-709.

González, A., Kafarov, V. (2011). Microalgae based biorefinery: Issues to consider. *Ciencia, Tecnología y Futuro*. 4:4:5-22.

González, A. (2010). Protocolos de extracción de aceite de microalgas de bioprospección nacional. Proyecto “bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel” código 2008D32006-6710. Centro de investigación para el desarrollo sostenible en industria y energía, Bucaramanga, Colombia: 11pp.

Gouveia, L., Oliveira, A.C. (2009). Microalgae as a raw material for biodiesel production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*36:269-274.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, Darzins, A.I. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.*54: 621-631.

Huppe, H. C., Turpin, D. H. (1994). Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 45: 577- 607.

Jhon Wiley & Sons. (2005) *Inc. Handbook of Food Analytical Chemistry*. United States of America: p.171.

Illman, A. M., Scragg, A. H., Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 631–635.

Lalibertè, G., De la Nouïe, J. (1993). Auto-, hetero-, and mixotrophic growth of *Chlamydomonas humicola* (cmloroimiyckak) on acetate. *J. Phycol.* 29: 612-620.

Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.O. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green algae *Neochloris oleabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 629-636.

Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cay, Z., Hu, Z. (2009). Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Phycol.* 21: 239-246.

Martínez, Ma. E., Camacho, A. F., Jimenez, J. M., Espinola, J. B. (1997). Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of *Chlorella pyrenoidosa* mixotrophic growth. *Process Biochem.* 32: 93-98.

Mendoza, H., Molina Cedres, C., De la Jara, A., Nordström, L., Freijanes, K., Carmona, L. (2008). Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Cryptocodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno. *Grasas Aceites*, 59: 27-32.

Merrett, M. J., and Syrett, P. J. (1960). The relationship between glucose oxidation and acetate oxidation in *Chlorella vulgaris*. *Physiol.* 13: 237-49.

Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20: 459-466.

Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., Staden, J. V., Lovász, C. (2011). Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J. Appl. Phycol.* 97: 11-19.

Pulz, O., Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 65: 635-648.

Rodolfi, L., Zitelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 100-112.

Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., & Betenbaugh, M.J. (2008) A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 430-436.

Rueda, L.V., Alfonso, L.Y., (2012). Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa y carbohidratos en cultivos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala de laboratorio. *Tesis de pregrado*. Escuela de Ingeniería Química, *Universidad Industria de Santander*, Bucaramanga, Colombia: 33pp.

Sansawa, H., Endo, H. (2004). Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 98:437–444.

Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephen, E., Marx, U.C., Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res* 1: 20-43.

Shin, H.-J., J.-M. Park, And J.-W. Yang. (1998). Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* [Beta]-galactosidase immobilized in chitosan beads. *Process Biochem.* 33(8): P. 787-792.

Shinto. H., T.Y., Kobayashi. T., Sekiguchi. T., Hanai. T., Kuriga Y., Okamoto. M., Sonomoto., K. (2008). Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone-butanol-ethanol fermentation. *Process Biochem.*43: P. 1452-1461.

Skjak-Braek, G. (1992). Alginates – biosynthesis and some structure function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. *Biochem. Soc. Trans.* 20: 27-33.

Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M.N. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J. Appl. Phycol.*20:245-251.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. Review. *J. Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96.

Syrett, P. J., Bocks, S. M., Merrett, M. J. (1964). The assimilation of acetate by *Chlorella vulgaris*. *Ibid* 15: 35-47.

Stewart, W.D.P. (1974). Algal physiology and biochemistry. Blackwell Scientific Publications Ltd. Osney Mead, Oxford.

Xiong, W., Gao, C., Yan, D., Wu, C., Wu, Q. (2010). Double CO₂ fixation in photosynthesis–fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresource Technology* 101: 2287–2293.

Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*:102-106.